

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Proteínas de fase aguda no periparto de éguas com  
placentite e seus respectivos neonatos**

**Cláudia Haetinger**

Pelotas, 2014

**CLÁUDIA HAETINGER**

**Proteínas de fase aguda no periparto de éguas com placentite e seus respectivos neonatos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Sanidade Animal).

Orientador: Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira

Co-Orientadora: Dra. Bruna da Rosa Curcio

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:  
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

M136p

Haetinger, Cláudia

Proteínas de fase aguda no periparto de éguas com placentite e seus respectivos neonatos / Cláudia Haetinger. – 45f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Área de concentração: Ciências veterinárias. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária. Pelotas, 2014. – Orientador Carlos Eduardo Wayne Nogueira ; coorientadora Bruna da Rosa Curcio.

1.Veterinária. 2.Parto. 3.Eletroforese. 4.Equinos. 5.Potro. 6.Glicoproteína ácida. 7.Proteína de fase aguda. 8.Placentite. I.Nogueira, Carlos Eduardo Wayne. II.Curcio, Bruna da Rosa. III.Título.

CDD: 636.1

**Banca examinadora:**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Bruna da Rosa Curcio

Prof<sup>a</sup>. Dra. Cristina Gevehr Fernandes

Prof. Dr. Charles Ferreira Martins

Prof. Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira

## **Agradecimentos**

Agradeço à minha família, pai, mãe e irmãos, pois sem ela não teria chegado até aqui.

Ao André, meu noivo, pelo apoio, companheirismo e cumplicidade, sempre me incentivando e transmitindo segurança nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, pela amizade, orientação acadêmica e, por muitas vezes, orientação para a vida.

Aos amigos que fiz, e às amizades que fortaleci durante a pós-graduação.

À Lorena Feijó, pela amizade e pelo seu empenho e dedicação para com os animais, projetos e trabalhos.

À minha amiga Patrícia Biegelmeyer, pelo “socorro” nos momentos de pânico com a estatística.

Às “minhas estagiárias”, Vitória, Natane e Rubia, sempre me auxiliando com muita disposição e alegria nos momentos tensos e nas “indiadas”.

Ao grupo ClinEq, por sua força de trabalho e dedicação.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e contribuição para com o trabalho.

## Resumo

HAETINGER, Cláudia. **Proteínas de fase aguda no periparto de éguas com placentite e seus respectivos neonatos**. 2014. 45f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A placentite ascendente é uma das principais causas de parto prematuro, aborto e nascimento de potros comprometidos, portanto a busca por marcadores precoces desta afecção se torna fundamental para o diagnóstico e tratamento no estágio inicial da doença. O objetivo deste estudo é caracterizar a concentração de proteínas de fase aguda no periparto de éguas com placentite e seus neonatos. No Artigo 1, foram utilizadas 24 éguas da raça Puro Sangue Inglês e seus respectivos neonatos, os quais foram divididos, através da avaliação histopatológica da placenta, em grupo Placentite (n=11) e grupo Hígido (n=13). Os animais foram submetidos à coleta de sangue no momento do parto, 18 horas e 7 dias após o parto. No Artigo 2, foram utilizadas 7 éguas mestiças e seus respectivos neonatos, as quais foram submetidas à indução de placentite ascendente entre os dias 290-300 de gestação. As éguas foram submetidas a coletas de sangue 60 dias pré-parto, 30 dias pré-parto, no dia da indução, 24 horas e 48 horas após a indução, no dia que antecedeu o parto, imediatamente após e 24 horas após o parto e os neonatos imediatamente após o nascimento, 12 horas, 24 horas e 48 horas após o nascimento. Em ambos os artigos, a concentração sérica de proteína total foi determinada pelo método colorimétrico, e a leitura realizada por espectrofotômetro e para a obtenção da concentração das frações proteicas, utilizou-se eletroforese em gel de acrilaminada contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Na avaliação estatística foi considerada significância de 5%. Foram observadas 23 bandas proteicas, com pesos moleculares de 16 KDa a 245 KDa. No Artigo 1 constatou-se, nas éguas, elevação de das frações proteicas no momento do parto, no qual as éguas com placentite apresentaram concentrações mais elevadas do que as híginas. Os potros provenientes das éguas com placentite apresentaram maior concentração de  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida após a ingestão de colostro. No artigo 2 as éguas submetidas a indução de placentite apresentaram elevação na  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida a partir das 48 horas após a inoculação da bactéria. Com os resultados podemos caracterizar as concentrações médias das Proteínas de Fase Aguda em éguas com placentite e seus neonatos para avaliação da saúde nesse período. Concluímos que a  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida pode ser indicada como um marcador inflamatório para a placentite.

Palavras-chave: Parto. Eletroforese. Potro.  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida. Equinos

## Abstract

HAETINGER, Cláudia. **Proteínas de fase aguda no periparto de éguas com placentite e seus respectivos neonatos**. 2014. 45f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The ascending placentitis is a major cause of premature birth, abortion and birth of compromised foals, so the search for early markers of this condition becomes critical for diagnosis and treatment in the early stage of the disease. The aim of this study is to characterize the concentration of acute phase proteins in periparturient mares with placentitis and their newborns. In Paper 1, 24 Thoroughbred mares and their neonates were used, which were divided by histopathologic examination of the placenta in group Placentitis (n = 11) and group Healthy (n = 13). The animals were subjected to blood collection at delivery, 18 hours and 7 days after delivery. In Paper 2, 7 mares and their neonates were used, which, the mares were subjected to induction of ascending placentitis between days 290-300 of gestation. The mares were subjected to blood sampling 60 days prepartum, 30 days prepartum, on the day of induction, 24 hours and 48 hours after induction, the day before delivery, immediately after and 24 hours after delivery and newborns immediately after birth, 12 hours, 24 hours and 48 hours after birth. Plasma total protein concentration was determined by the colorimetric method, and reading performed by spectrophotometer. To obtain the concentration of protein fractions was used acrilaminada gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). At the statistical evaluation was considered significance of 5%. Were observed 23 protein bands with molecular weights of 16 kDa to 245 kDa. In Paper 1 it was found, in mares, elevated protein fractions at delivery, in which mares with placentitis showed higher concentrations than healthy mares. The foals from mares with placentitis showed higher concentration of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein after ingestion of colostrum. In Paper 2 mares subjected to induction of placentitis had increased  $\alpha$ 1-acid glycoprotein from 48 hours after bacterial inoculation. With the results we show the average concentrations of acute phase proteins in mares with placentitis and their newborns for health assessment on that period. We speculate that  $\alpha$ 1-acid glycoprotein may be indicated as an inflammatory marker for placentitis, but more studies are needed.

Keywords: Labor. Electrophoresis. Foal.  $\alpha$ 1-acid glycoprotein. Equine

## Lista de Figuras

### **ARTIGO 2 Resposta de fase aguda no periparto de éguas com placentite ascendente e seus respectivos neonatos**

- Figura 1    Concentração sérica de  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida em éguas com placentite ascendente 60 (M1) e 30 dias pré-parto (M2), no dia da indução da placentite (M3), 24 horas (M4) e 48 horas após a indução (M5), no dia que antecedeu o parto (M6), imediatamente após (M7) e 24 após o parto (M8)..... 33



## **Lista de Tabelas**

### **ARTIGO 1 Proteínas de fase aguda no periparto de éguas com placentite e seus respectivos neonatos**

Tabela 1 Média e desvio padrão das concentrações das frações proteicas (mg/dL) e da proteína total (g/dL) nas éguas híidas e com placentite no momento do parto (M1), 18 horas após o parto (M2) e 7 dias após o parto (M3)..... 21

Tabela 2 Média e desvio padrão das concentrações das frações proteicas (mg/dL) e da proteína total (g/dL) nos potros provenientes de éguas híidas e com placentite no momento do parto (M1), 18 horas após o parto (M2) e 7 dias após o parto (M3)..... 22

### **ARTIGO 2 Resposta de fase aguda no periparto de éguas com placentite ascendente e seus respectivos neonatos**

Tabela 3 Média e desvio padrão das concentrações das frações proteicas (mg/dL) e da proteína total (g/dL) em éguas com placentite ascendente nos momentos: 60 dias pré-parto (M1), 30 dias pré-parto (M2), no dia da indução (M3), 24 horas (M4) e 48 horas após a indução (M5), no dia que antecedeu o parto (M6), imediatamente após o parto (M7) e 24 horas após o parto (M8)..... 34

Tabela 4 Média e desvio padrão das concentrações das frações proteicas (mg/dL) e da proteína total (g/dL) nos potros provenientes de éguas com placentite ascendente nos momentos: imediatamente após o nascimento (C1), 12 horas (C2), 24 horas (C3) e 48 horas após o nascimento (C4)..... 35

## **Lista de Abreviaturas**

AAS – Amiloide A Sérica

COX-2 – Cicloxigenase-2

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IL-1 – Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

IL-12 – Interleucina 12

IL-18 – Interleucina 10

mg/dL - Miligramas por decilitro

NOS2 – Óxido nítrico sintetase 2

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

PCR – Proteína C-reativa

PFA – Proteína de fase aguda

PSI – Puro Sangue Inglês

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

## Sumário

1 Introdução.....	10
2 Objetivos.....	14
3 Artigos.....	15
4 Conclusão geral.....	40
5 Referências.....	41

## 1 INTRODUÇÃO

Perdas de gestações em estágio avançado representam um grande problema para a indústria equina, afetando éguas que não só irão deixar de produzir um potro, mas terão baixos índices de concepção nos próximos acasalamentos (RICKETTS, 2008). A causa mais frequente de perda em gestações avançadas em éguas está associada à placentite, que é frequentemente causada por uma infecção ascendente que apresenta como porta de entrada a cérvix e representa mais de 30% de partos prematuros e perdas dentro das primeiras 24 horas de vida (LEBLANC, 2008). O principal patógeno causador de infecções placentárias é o *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* (GILES et al., 1993). Um diagnóstico definitivo de placentite é feito através da cultura e exame histopatológico do alantocórion e, quando ocorre aborto, do feto (SERTICH, 1993).

A identificação precoce de éguas de risco com gestação comprometida exige supervisão minuciosa dos parâmetros fetomaternais e eventos periparturientes, de modo a permitir, de maneira precoce, a detecção, manejo e possível prevenção de doenças perinatais. Além disso, o reconhecimento precoce de sinais de sofrimento fetal e padrões de desenvolvimento anormais auxiliam a entender a patofisiologia do neonato após o nascimento. A habilidade para diagnosticar e entender disfunções placentárias durante a gestação em equinos é limitada devido à inabilidade de se obter amostras seguras do alantocórion para avaliação histopatológica (BUCCA, 2006).

A pesquisa para se determinar marcadores precoces da inflamação vem sendo foco em medicina humana e veterinária ao longo dos anos, utilizando, principalmente, a identificação das proteínas de fase aguda como marcadores do grau e do curso da inflamação. Em resposta a infecção ou injúria, essas proteínas são rapidamente liberadas na corrente sanguínea e suas concentrações são diretamente relacionadas com a severidade da condição subjacente do animal (CRISMAN et al., 2008).

As proteínas de fase aguda (PFAs) são glicoproteínas sintetizadas pelos hepatócitos, que sofrem alteração de concentração em animais submetidos a injúrias internas e externas, assim como infecção, inflamação, trauma cirúrgico ou estresse (MURATA et al., 2004). São encontradas no soro em altas concentrações durante a instalação do processo inflamatório (ALSEMGEEST et al., 1994), podendo ser avaliadas em situações clínicas, pois se acredita que sejam melhores indicadores da resposta sistêmica ao processo inflamatório ou infeccioso do que outras variáveis, tais como febre, aumento no tempo de sedimentação de eritrócitos e leucocitose associada à neutrofilia (HORADAGODA et al., 1999).

A principal função das PFAs é de contribuir para a defesa do organismo durante a inflamação, modulando o sistema imune, transportando moléculas para prevenir sua perda em potencial ou protegendo tecidos de injúrias excessivas geradas pelos mediadores inflamatórios (PETERSON et al., 2004). As concentrações circulantes das PFAs são relacionadas com a severidade da desordem e da área de tecido afetado (KENT e GOODALL, 1991) e a quantificação da sua concentração pode fornecer informações para diagnóstico e prognóstico sobre a afecção do animal (MURATA et al., 2004; PETERSEN et al., 2004). Em resposta à infecção, essas proteínas são rapidamente liberadas na corrente sanguínea e suas concentrações plasmáticas variam em, pelo menos, 25% durante a inflamação (CRISMAN et al., 2008).

As proteínas de fase aguda podem ser classificadas como positivas ou negativas (KANEKO et al., 1997). As positivas são aquelas que apresentam um aumento na sua concentração na presença de estímulo inflamatório, e as negativas apresentam decréscimo na concentração na presença deste estímulo. Nas proteínas positivas, enquadram-se, dentre outras, a  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida, a haptoglobina (TAKIGUCHI et al., 1990) e a amiloide A sérica (AAS) (CRISMAN et al., 2008). No segundo grupo, destacam-se a albumina e a transferrina, cujos níveis séricos tendem a decrescer na presença de condições inflamatórias (KANEKO et al., 1997). Ainda dentre as proteínas positivas, são subclassificadas como positivas maiores e positivas moderadas (HULTEN et al., 2002). As PFAs positivas maiores se caracterizam por apresentar concentrações baixas ou indetectáveis no sangue de indivíduos sadios; elevação rápida na sua concentração acima de dez vezes na resposta aguda; e decréscimo rápido com a resolução da doença. As PFAs positivas moderadas estão sempre presentes em nível basal no plasma de indivíduos

saudáveis, e suas concentrações aumentam de 1 a 10 vezes no processo inflamatório, sendo sua resposta mais lenta, demorando dias a semanas para aumentar, atingir o pico e voltar aos valores basais (CRISMAM et al., 2008).

PFAs como a amiloide A, haptoglobina,  $\alpha$ -1 glicoproteína ácida e ceruloplasmina estão presentes no colostro e leite de diversas espécies e algumas foram demonstradas ser absorvidas intactas através do intestino (TALUKDER et al., 2002; HARADA et al., 2002).

A presença de infecções bacterianas uterinas, no pós-parto, pode estimular a síntese de determinadas proteínas de fase aguda de interesse veterinário, como fibrinogênio, ceruloplasmina, proteína C-reativa, antitripsina, haptoglobina e glicoproteína ácida (ALSEMGEEST et al., 1994). A concentração sérica de proteínas no período neonatal também varia com a idade (PALTRINIERI et al., 2008). Valores normais de referência para a concentração sérica de proteínas em potros do nascimento até 1 ano de idade foram estabelecidas (BAUER et al., 1985). O aumento da concentração sérica de PFAs no pós-parto reflete a inflamação fisiológica do processo de parto (NUNOKAWA et al., 1993; DUGGAN et al., 2007).

A PFA mais específica em equinos, e por conta disso a mais estudada na espécie, é a AAS. A elevação de sua concentração basal pode ser 10 a mil vezes (HULTEN et al., 2002). Essa PFA já é conhecida como marcador inflamatório em sepsis de potros (STONEHAM et al., 2001) e vem sendo estudada como marcador inflamatório para placentite em éguas (COUTINHO et al., 2013).

Avaliações laboratoriais são de grande importância no monitoramento de enfermidades infecciosas, sendo que o leucograma se destaca como a análise mais comumente utilizada. Fagliari e Silva (2002) destacaram grande importância no proteinograma sérico como monitoramento e/ou identificação de enfermidades infecciosas ou focos infecciosos, relacionando as alterações ocorridas no sítio inflamatório com a liberação de citocinas e a síntese de proteínas de fase aguda.

O estudo eletroforético representa uma das principais ferramentas para identificar proteínas sanguíneas (KANEKO et al., 1997). As técnicas mais utilizadas na medicina veterinária tiveram como primórdio a banda celular de acetato de celulose (FAGLIARI et al., 1983) e o filme de agarose (MATTEWS, 1982), porém todos estes provêm bandagens limitadas. Segundo Fagliari e Silva (2002) a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), além de ser de fácil execução, baixo custo e necessitar de um volume

reduzido de amostra, possibilita a visualização de concentrações proteicas extremamente baixas e a identificação de 20 a 30 proteínas com pesos moleculares que variam entre 24.000 a 340.000 daltons.

Devido à dificuldade de se coletar amostras para o diagnóstico definitivo de infecções placentárias durante a gestação em equinos, buscamos estudar métodos mais seguros e simplificados para identificação dessas afecções. Com isso, o objetivo deste estudo é avaliar a concentração de proteínas de fase aguda no periparto em éguas híginas e de éguas com placentite, e seus respectivos neonatos.

## **2 OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

O objetivo deste estudo foi avaliar a concentração de proteínas de fase aguda no periparto em éguas híidas e em éguas com placentite, e seus respectivos neonatos.

### **Objetivos Específicos**

- Determinar as concentrações de PFAs no pós-parto de éguas e potros da raça Puro Sangue Inglês;
- Identificar diferenças nas concentrações de PFAs em éguas que apresentaram placentite espontânea e seus respectivos potros;
- Determinar as concentrações de PFAs pré e pós-indução de placentite e após o parto em éguas induzidas;
- Determinar as concentrações de PFAs após o parto em potros provenientes de éguas com placentite induzida;



### **3 ARTIGOS**

#### **3.1 Artigo 1**

## **PROTEÍNAS DE FASE AGUDA NO PERIPARTO DE ÉGUAS COM PLACENTITE E SEUS RESPECTIVOS NEONATOS**

C. Haetinger; V. Müller; L.S. Feijó; N.M. Saraiva; L.A. Amaral; B.R. Curcio; C.E.W.  
Nogueira.

**Submetido à revista** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*

# PROTEÍNAS DE FASE AGUDA NO PÓS PARTO DE ÉGUAS PSI COM PLACENTITE ESPONTÂNEA E SEUS RESPECTIVOS NEONATOS

## ACUTE PHASE PROTEINS IN POSTPARTUM THOROUGHBRED MARES WITH SPONTANEOUS PLACENTITIS AND THEIR NEWBORN

C. Haetinger<sup>II\*</sup>; V. Müller<sup>I</sup>; L.S. Feijó<sup>II</sup>; N.M. Saraiva<sup>I</sup>; L.A. Amaral<sup>II</sup>; B.R. Curcio<sup>III</sup>; C.E.W. Nogueira<sup>III</sup>.

<sup>I</sup>Graduando, Faculdade de Veterinária, UFPel, Pelotas, RS

<sup>II</sup>Pós – Graduando, Faculdade de Veterinária, UFPel, Pelotas, RS

<sup>III</sup>Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, UFPel, Pelotas, RS

\*cloue\_haet@hotmail.com

### RESUMO

A placentite ascendente é uma das principais causas de parto prematuro, aborto e nascimento de potros comprometidos, portanto a busca por marcadores precoces desta afecção se torna fundamental para o diagnóstico e tratamento no estágio inicial da doença. O objetivo deste estudo foi caracterizar a concentração de proteínas de fase aguda no pós parto de éguas com placentite e seus respectivos neonatos. Foram utilizadas 24 éguas PSI e seus respectivos neonatos, os quais foram divididos, através da avaliação histopatológica da placenta, em grupo Placentite (n=11) e grupo Hígido (n=13). Os animais foram submetidos à coleta de sangue no momento do parto, 18 horas e 7 dias após o parto. A concentração sérica de proteína total foi determinada pelo método colorimétrico, e a leitura realizada por espectrofotômetro. Para obtenção da concentração das frações protéicas, utilizou-se eletroforese em gel de acrilaminada contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foram observadas 23 bandas protéicas, com pesos moleculares de 16 KDa a 245 KDa. Constatou-se, nas éguas, elevação das frações protéicas no momento do parto, no qual as éguas com

placentite apresentaram concentrações mais elevadas do que as hípidas. Os potros provenientes das éguas com placentite apresentaram maior concentração de  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida após a ingestão de colostro. Com estes resultados podemos demonstrar as concentrações médias das Proteínas de Fase Aguda em éguas com placentite e seus neonatos para avaliação da saúde nesse período. A  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida pode ser indicada como um marcador inflamatório para potros neonatos de risco.

Palavras-chave: Potros,  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida, Obstetrícia, Parto, Eletroforese

#### ABSTRATC

The ascending placentitis is a major cause of premature birth, abortion and birth of compromised foals, so the search for early markers of this condition becomes critical for diagnosis and treatment in the early stage of the disease. The aim of this study is to characterize the concentration of acute phase proteins in periparturient mares with placentitis and their newborns. Were used 24 Thoroughbred mares and their neonates, which were divided by histopathologic examination of the placenta in group Placentitis (n = 11) and group Healthy (n = 13). The animals were subjected to blood collection at delivery, 18 hours and 7 days after delivery. Serum total protein concentration was determined by the colorimetric method, and reading performed by spectrophotometer. To obtain the concentration of protein fractions was used acrilaminada gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). Were observed 23 protein bands with molecular weights of 16 kDa to 245 kDa. It was found, in mares, elevated protein fractions at delivery, in which mares with placentitis showed higher concentrations than healthy mares. The foals from mares with placentitis showed higher concentration of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein after ingestion of colostrum. With the results we show the average concentrations of acute phase proteins in mares with placentitis and their newborns for health assessment that period. The  $\alpha$ 1-acid glycoprotein may be indicated as an inflammatory marker for neonatal foals at risk.

Keywords: Foal,  $\alpha$ 1-acid glycoprotein, Obstetrics, Labor, Electrophoresis

#### INTRODUÇÃO

Potros provenientes de éguas com placentite podem ter seu nascimento antecipado, apresentando tamanhos pequenos e funcionalidade dos órgãos incompatível com a vida, ou nascimento de potros a termo, porém com comprometimento e até mesmo de potros sem

nenhum grau de alteração. As avaliações perinatais desses potros são de grande importância, principalmente para os proprietários, pois o tratamento de potros comprometidos é dispendioso, e nem sempre resulta em bom prognóstico, tornando de grande importância a busca por marcadores precoces (Bain, 2004).

A pesquisa para se identificar marcadores precoces da inflamação é foco na medicina humana e veterinária utilizando principalmente a identificação das “proteínas de fase aguda” (PFAs) como marcadores do grau e do curso da inflamação. Em resposta a infecção ou injúria, essas proteínas são rapidamente liberadas na corrente sanguínea e suas concentrações são diretamente relacionadas com a severidade da afecção do animal (Crisman *et al.*, 2008).

PFAs são proteínas sanguíneas que sofrem alteração de concentração em animais submetidos a injúrias internas e externas, assim como infecção, inflamação, trauma cirúrgico ou stress (Murata *et al.*, 2004). As concentrações circulantes das PFAs são relacionadas com a severidade da desordem e da área de tecido afetado (Kent e Goodall, 1991) e a quantificação da sua concentração pode fornecer informações para diagnóstico e prognóstico sobre a afecção do animal (Murata *et al.*, 2004; Petersen *et al.*, 2004).

As proteínas de fase aguda podem ser classificadas como positivas ou negativas (Kaneko *et al.*, 1997). As positivas são aquelas que apresentam um aumento na sua concentração na presença de estímulo inflamatório, e as negativas apresentam decréscimo na concentração na presença deste estímulo. Nas proteínas positivas, enquadram-se, dentre outras, a glicoproteína ácida, a haptoglobina (Takiguchi *et al.*, 1990) e a Amilóide A Sérica (AAS) (Crisman *et al.*, 2008). No grupo das proteínas negativas, destacam-se a albumina e a transferrina, cujos níveis séricos tendem a decrescer na presença de condições inflamatórias (Kaneko *et al.*, 1997).

O estudo eletroforético representa uma das principais ferramentas para identificar proteínas sanguíneas (Kaneko *et al.*, 1997). Segundo Fagliari e Silva (2002) a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), além de ser de fácil execução, baixo custo e necessitar de um volume reduzido de amostra, possibilita a visualização de concentrações protéicas extremamente baixas e a identificação de 20 a 30 proteínas com pesos moleculares que variam entre 24.000 a 340.000 daltons.

O objetivo deste estudo é caracterizar a concentração de proteínas de fase aguda no pós parto de éguas com placentite e seus respectivos neonatos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 24 éguas, entre 5 e 21 anos de idade e seus respectivos neonatos de um criatório da região de Bagé-RS (-31°19'S, -54°06'W), durante a temporada reprodutiva de 2011. Os animais eram mantidos durante o verão em campo nativo e durante o inverno sob consorciação de azevém (*Lolium multiflorum*), trevo branco (*Trifolium repens*) e cornichão (*Lotus corniculatus*) como pastagem cultivada e água disponível ad libitum. A suplementação era realizada através de ração balanceada com garantia de 12% de proteína e 27,5% mCal de energia digerível. Os grupos experimentais foram divididos através da avaliação histopatológica da placenta, de acordo com método proposto por Lins *et al.* (2012), na qual as éguas do grupo Placentite (n=11) apresentaram infiltrado celular grave, e as éguas do grupo Hígido (13) tiveram placentas sem alteração. Cada animal foi submetido a coleta de sangue por punção da veia jugular em 3 momentos: no momento do parto (M1), 18 horas após o parto (M2) e 7 dias após o parto (M3), totalizando 144 amostras.

A concentração sérica de proteína total foi determinada pelo método colorimétrico, por reação com o biureto, utilizando-se kit comercial (Labtest), e a leitura realizada por espectrofotômetro. Para obtenção da concentração das frações protéicas, utilizou-se eletroforese em gel de acrilaminada contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por Laemmli (1970). Após o fracionamento, o gel foi corado durante 10min em solução de azul de coomassie e, em seguida, colocado em solução de ácido acético a 7% para retirar o excesso de corante, até que as frações protéicas se apresentassem nítidas. As concentrações dessas proteínas foram determinadas em densitômetro computadorizado (Shimadzu CS 9301 - Tokio, Japan). Como referência, utilizou-se uma solução marcadora (Sigma - Saint Louis, EUA) com pesos moleculares 29.000, 45.000, 66.000, 97.400, 116.000 e 205.000 dáltons (Da), além de proteínas purificadas – albumina, IgG, haptoglobina e transferrina.

Para avaliar a influência dos diferentes momentos nas proteínas de fase aguda, foi realizada análise de variância simples pelo teste One Way AOV, com a comparação entre médias através do teste LSD. Os dados que não apresentaram distribuição normal no teste de normalidade Shapiro-Wilk, foram analisados através do teste Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV. Estes resultados foram analisados através do programa Statistics 8.0.

Para avaliar uma possível correlação entre éguas e potros, foi realizada correlação de Pearson avaliando cada momento, e para os dados que não apresentaram distribuição normal, foi realizada correlação de Spearman.

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Federal de Pelotas apresentando o número 1589/2012.

## RESULTADOS

No método utilizado foram observadas 23 bandas protéicas, cujos pesos moleculares (PM) variaram de 16 KDa a 245 KDa, sendo possível a identificação das seguintes frações protéicas: imunoglobulina A (175 KDa), ceruloplasmina (102 KDa), transferrina (83 KDa), albumina (63 KDa), imunoglobulina G de cadeia pesada (50 KDa), haptoglobina (41 KDa),  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida (39 KDa) e imunoglobulina G de cadeia leve (28 KDa).

Os valores médios das PFAs encontrados em cada momento analisado nas éguas PSI e seus respectivos neonatos estão expressos nas Tab. 1 e 2.

A proteína sérica total (PT) das éguas apresentou-se elevada no momento do parto em ambos os grupos ( $p < 0,05$ ). As éguas hígidias apresentaram maior concentração de albumina no parto ( $p < 0,05$ ), ocorrendo diminuição até as 18h, se mantendo estável até 7 dias após o parto. Nas éguas com placentite, a albumina apresentou maior concentração no parto ( $p < 0,05$ ), com diminuição até as 18h e diminuindo novamente até 7 dias; a IgG de cadeia leve apresentou maior concentração no parto, com diminuição até as 18h e mantendo-se estável em 7 dias; e a proteína de peso molecular 23 kDa teve diminuição na sua concentração de maneira gradativa, apresentando maior concentração no parto, e menor concentração nos 7 dias após.

Nas éguas do grupo Placentite, observou-se valores elevados das frações protéicas em comparação com as éguas do grupo Hígido. A PT, albumina, IgG de cadeia leve, IgG total e a proteína de 23 KDa tiveram concentração mais elevada nas éguas com placentite no parto e nas 18h após o parto.

Tabela 1. Média e desvio padrão das concentrações das frações protéicas (mg/dL) e da proteína total (g/dL) nas éguas hígidias e com placentite no momento do parto (M1), 18 horas após o parto (M2) e 7 dias após o parto (M3).

Proteína	Grupo	N	Parto (M1)	N	18h (M2)	N	7 dias (M3)
PT (α/dL)	Hígidios	13	7.4±0.9 Bx	13	6.5±0.7 By	13	6.3±0.7 y
	Placentite	11	8.3±0.6 Aa	11	7.7±0.9 Aa	11	6.8±0.9 b
Albumina	Hígidios	13	4739±697 Bx	13	3983±554 By	13	3840±571 y
	Placentite	11	5172±401 Aa	11	4626±619 Ab	11	3925±661 c
Ceruloplasmina	Hígidios	13	9.1±4.2	13	7.3±3.8	13	6.5±3.8
	Placentite	11	6.1±5	11	5.3±3.3	11	7.8±6.5
	Hígidios	13	8.4±5.9	13	6.9±4.2	13	8.3±6.3
α1-GA	Placentite	11	11±12	11	10±11	11	9.9±7.9
	Hígidios	13	88±46	13	76±38	13	71±44
Haptoglobina	Placentite	11	101±51	11	84±60	11	77±42
	Hígidios	13	127±60	13	163±58	13	155±55
IgA	Placentite	11	112±62	11	141±66	11	128±48
	Hígidios	13	739±143 Bx	13	461±116 Bxy	13	417±122 y
IgG Leve	Placentite	11	783±128 Aa	11	691±173 Aa	11	528±167 b
	Hígidios	13	646±110	13	681±158	13	679±170
IgG Pesada	Placentite	11	615±123	11	745±228	11	712±141
	Hígidios	13	1385±153 B	13	1143±259 B	13	1006±379
IgG Total	Placentite	11	1398±191 A	11	1441±327 A	11	1240±237
	Hígidios	13	523±85	13	404±84	13	398±89
Transferrina	Placentite	11	533±102	11	506±110	11	459±71
	Hígidios	13	469±176 B	13	356±110 B	13	348±69
23 kDa	Placentite	11	530±100 Aa	11	445±94 Ab	11	398±65 c

As letras maiúsculas (A e B) representam diferença estatística ( $p<0.05$ ) entre os Grupos/linhas; as letras minúsculas (a, b e c) representam diferença entre o momento/colunas do grupo placentite e letras x e y entre as colunas do grupo hígidios.

Nos neonatos do grupo Hígidios, a PT, IgG de cadeia leve, IgG de cadeia pesada e IgG total demonstraram-se com menor concentração no parto, aumentando nas 18h após e mantendo-se estáveis em 7 dias. Já a ceruloplasmina, a IgA e a proteína de 23 kDa mantiveram a concentração mais baixa no parto e 18h, elevando-se nos 7 dias. Já nos neonatos do grupo Placentite, a PT, IgG de cadeia leve, IgG de cadeia pesada e IgG total apresentaram-se com concentrações mais baixas no momento do parto, aumento nas 18 horas após o parto, e a proteína de 23 kDa teve aumento na concentração em 7 dias após o parto. A haptoglobina se comportou de maneira contrária, com maior concentração no parto, diminuindo nas 18h e mantendo estável 7 dias após o parto. As frações proteicas dos neonatos nascidos das éguas do grupo Placentite apresentaram concentrações mais elevadas

imediatamente após o parto, porém não significativas, em comparação com os nascidos de éguas híidas, exceto pela albumina, que apresentou-se significativamente menor nos potros provenientes de éguas com placentite. Já nas 18 horas após o nascimento, os potros do grupo Placentite apresentaram maior concentração de  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida, em relação aos do grupo Híidas.

Tabela 2. Média e desvio padrão das concentrações das frações protéicas (mg/dL) e da proteína total (g/dL) nos potros provenientes de éguas híidas e com placentite no momento do parto (M1), 18 horas após o parto (M2) e 7 dias após o parto (M3).

Proteína	Grupo	N	Parto (M1)	N	18h (M2)	N	7 dias (M3)
PT (g/dL)	Híidas	13	4.3 $\pm$ 0.5y	13	5.8 $\pm$ 1.3 x	13	5.8 $\pm$ 0.9 x
	Placentite	11	4.2 $\pm$ 0.3 b	11	5.6 $\pm$ 0.8 a	11	5.8 $\pm$ 0.7 a
Albumina	Híidas	13	3368 $\pm$ 464 A	13	3477 $\pm$ 695	13	3409 $\pm$ 551
	Placentite	11	2951 $\pm$ 359 B	11	3178 $\pm$ 626	11	3105 $\pm$ 379
Ceruloplasmina	Híidas	13	5 $\pm$ 2.8 y B	13	8.1 $\pm$ 4.8y	13	13 $\pm$ 8.1 x
	Placentite	11	7.8 $\pm$ 4 A	11	7.7 $\pm$ 3.8	11	13 $\pm$ 8.9
$\alpha$ 1-GA	Híidas	13	12 $\pm$ 4.7	13	8.7 $\pm$ 4.4 B	13	14 $\pm$ 10
	Placentite	11	17 $\pm$ 12	11	16 $\pm$ 12 A	11	18 $\pm$ 10
Haptoglobina	Híidas	13	103 $\pm$ 47 x	13	58 $\pm$ 18 y	13	79 $\pm$ 43 y
	Placentite	11	115 $\pm$ 74	11	86 $\pm$ 62	11	82 $\pm$ 43
IgA	Híidas	13	48 $\pm$ 7.8 y	13	50 $\pm$ 15 y	13	68 $\pm$ 16 x
	Placentite	11	70 $\pm$ 66	11	61 $\pm$ 47	11	86 $\pm$ 46
IgG Leve	Híidas	13	3.3 $\pm$ 2 y	13	472 $\pm$ 281 x	13	337 $\pm$ 197 x
	Placentite	11	43 $\pm$ 121 b	11	431 $\pm$ 166 a	11	320 $\pm$ 148 a
IgG Pesada	Híidas	13	18 $\pm$ 64 y	13	924 $\pm$ 500 x	13	695 $\pm$ 312 x
	Placentite	11	95 $\pm$ 135 b	11	789 $\pm$ 254 a	11	731 $\pm$ 254 a
IgG Total	Híidas	13	21 $\pm$ 64 y	13	1396 $\pm$ 779 x	13	1032 $\pm$ 503 x
	Placentite	11	138 $\pm$ 225 b	11	1221 $\pm$ 390 a	11	1051 $\pm$ 392 a
Transferrina	Híidas	13	409 $\pm$ 112	13	339 $\pm$ 90	13	396 $\pm$ 53
	Placentite	11	414 $\pm$ 101	11	394 $\pm$ 73	11	440 $\pm$ 108
23 kDal	Híidas	13	133 $\pm$ 60 y	13	199 $\pm$ 76 y	13	450 $\pm$ 116 x
	Placentite	11	172 $\pm$ 80 b	11	210 $\pm$ 75 b	11	452 $\pm$ 81 a

As letras maiúsculas (A e B) representam diferença estatística ( $p < 0.05$ ) entre as linhas, mas somente entre os dois grupos; as letras minúsculas (a, b e c) representam diferença entre as colunas do grupo Placentite e letras x, y e z entre as colunas do grupo Híidas.

Na correlação analisada entre éguas e potros, não houve significância, utilizando  $P < 0.05$ .

## DISCUSSÃO

Estudos utilizando proteínas de fase aguda como marcadores precoces de inflamação têm sido foco na medicina humana e veterinária (Cicarelli *et al.*, 2005; Coutinho *et al.*, 2013).



Segundo Fagliari e Silva (2002), o estudo eletroforético representa uma das principais ferramentas para identificar proteínas sanguíneas e a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) possibilita a visualização de concentrações protéicas baixas e a identificação de 20 a 30 proteínas com pesos moleculares que variam entre 24 kDa a 340 kDa. Em nosso estudo foram identificadas 23 bandas protéicas, cujos pesos moleculares variaram de 16 KDa a 245 KDa e foi possível a identificação das frações protéicas imunoglobulina A (175 KDa), ceruloplasmina (102 KDa), transferrina (83 KDa), albumina (63 KDa), imunoglobulina G de cadeia pesada (50 KDa), haptoglobina (41 KDa),  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida (39 KDa) e imunoglobulina G de cadeia leve (28 KDa).

Quando avaliadas as diferentes concentrações de PFAs entre os momentos analisados, foi observada maior concentração das frações protéicas no momento do parto, no qual a proteína total (PT), a albumina e a IgG de cadeia leve tiveram maior concentração significativamente. A albumina é considerada uma proteína de fase aguda negativa, ou seja, ocorre um desvio em sua síntese quando o fígado é requisitado para a produção de outras proteínas, tais como as proteínas de fase aguda, ou em decorrência de distúrbios hepáticos, fazendo com que ocorra um decréscimo na presença de condições inflamatórias (Kaneko *et al.*, 1997). O aumento da PT e da albumina observados nesse estudo no momento do parto nas éguas justifica-se pela desidratação decorrente do parto. Aoki (2012) e Kaneko (1997) relatam que o aumento temporário da albumina e da PT nas éguas no momento do parto é decorrente da desidratação, do mesmo modo que o aumento das globulinas. Já a maior concentração das frações protéicas nas éguas com placentite, quando em comparação com as éguas híginas, justifica-se provavelmente pelo crescimento microbiano já presente nas éguas com placentite. Diaw *et al* (2010), estudaram as características microbiológicas uterinas após o parto em éguas que tiveram gestação saudável e éguas com placentite, e observaram que éguas que tiveram placentite apresentaram crescimento bacteriano intrauterino, mesmo após tratamento sistêmico intenso.

Os resultados encontrados nos neonatos desse estudo demonstraram menor concentração das frações protéicas no momento do parto, aumentando após a ingestão do colostro. Kaneko (1997) afirma que, logo após o nascimento, a proteína sérica e plasmática das principais espécies animais apresenta baixos valores devido às quantidades mínimas de globulinas e baixos teores da albumina. Quando o recém-nascido ingere o colostro, um rápido aumento das imunoglobulinas, ocorre como resultado da absorção das imunoglobulinas colostrais, já a elevação da albumina se deve à ingestão de compostos nitrogenados na dieta. PFAs como a amilóide A sérica, haptoglobina,  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida e ceruloplasmina estão

presentes no colostro e leite de diversas espécies e algumas foram demonstradas ser absorvidas intactas através do intestino (Talukder *et al.*, 2002; Harada *et al.*, 2002). Segundo Duncan *et al.* (1994), em potros a concentração de PT é menor ao nascimento, aumenta após a absorção colostrar, declina em 1 a 5 semanas e então aumenta até níveis semelhantes aos dos adultos entre 6 meses a 1 ano. Estes mesmos autores relatam que o declínio entre 1-5 semanas está relacionado à metabolização e consumo das imunoglobulinas.

Os potros apresentaram aumento significativo na concentração de IgG a partir das 12 horas após o nascimento, que representa a concentração de imunoglobulinas adquiridas por transferência passiva, através da ingestão do colostro. O tipo de ligação placentária em equinos impede a transferência placentária de imunoglobulinas da égua para o feto durante a gestação, assim, os potros nascem agamaglobulinêmicos (Jeffcott, 1971). O colostro fornece uma fonte imediata de imunoglobulinas e a falha na absorção ou aquisição dos anticorpos do colostro, ou falha na transferência passiva no primeiro dia de vida tem sido reconhecido como um importante fator de risco para a infecção (Cohen, 1994). O pico da concentração sérica de IgG é entre 18 e 24 horas de vida do potro, sendo este o momento ideal para se buscar se houve falha na transferência passiva de anticorpos. O valor de corte, mais comumente utilizado para a avaliação de absorção de IgG é de 800 mg IgG/dl, no qual potros que apresentam valores abaixo deste são candidatos a suplementação com transfusão de plasma. Potros saudáveis apresentam frequentemente valores em torno de 2,400 mg IgG/dl (Barton, 2008). No presente estudo, após a ingestão de colostro, os neonatos provenientes de éguas híginas apresentaram em média 1,396 mg IgG/dl e os potros provenientes das éguas do estudo de campo pertencentes ao grupo Placentite, apresentaram em média 1,221 mg IgG/dl. Já os neonatos nascidos de éguas com placentite induzida apresentaram concentração média de  $847 \pm 240$  mg IgG/dl nas 24 horas após o nascimento. Este achado corrobora com a concentração média de 959 mg IgG/dl encontrada por Barton (2006), que avaliou a concentração de IgG em potros neonatos comprometidos com 24 a 72 horas de vida.

Quando comparados aos potros do grupo Híginos, os potros provenientes de éguas com placentite apresentaram, significativamente, menor concentração de albumina e maior concentração de ceruloplasmina logo após o parto, porém numericamente, as frações protéicas de maneira geral se apresentaram com maior concentração após o parto nesses potros. Estes achados são compatíveis com achados hematológicos e bioquímicos encontrados em potros provenientes de éguas com placentite, os quais apresentaram valores elevados de leucócitos, fibrinogênio e concentração de creatinina sérica ao nascimento (Bain, 2004). Nas 18 horas após o nascimento, os neonatos provenientes de éguas com placentite apresentaram uma

concentração de  $\alpha 1$ -glicoproteína ácida maior quando comparados aos potros provenientes de éguas híginas, após a ingestão do colostro. Este resultado pode indicar esta fração protéica como possível marcador inflamatório para potros neonatos de risco.

## CONCLUSÃO

Com os resultados podemos caracterizar as concentrações médias das Proteínas de Fase Aguda em éguas com placentite após o parto e seus respectivos neonatos para avaliação da saúde nesse período. A  $\alpha 1$ -glicoproteína ácida pode ser indicada como um marcador inflamatório para potros neonatos de risco.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOKI, T.; ISHII, M. Hematological and Biochemical Profiles in Peripartum Mares and Neonatal Foals (Heavy Draft Horse). *J. of Eq. Vet. Sci.*, v.32, p.170-176, 2012.
- BAIN, F.T. Management of the Foal From the Mare With Placentitis: A Clinician's Approach. *AAEP Proceedings*, v.50, p.162-164, 2004.
- BARTON, M.H. What's Got Them Covered? Innate Immunity and Passive Transfer of IgG. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners - Focus Meeting. First Year of Life Austin, Texas, USA – 2008*.
- BARTON, M.H.; HURLEY, D.; NORTON, N.; *et al.* Serum Lactoferrin and Immunoglobulin G Concentrations in Healthy or Ill Neonatal Foals and Healthy Adult Horses. *J Vet Intern Med.*, v.20, p.1457–1462, 2006.
- CICARELLI, L.M.; PERRONI, A.G.; ZUGAIB, M.; *et al.* Maternal and Cord Blood Levels of Serum Amyloid A, C-Reactive Protein, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$ , and Interleukin-8 During and After Delivery. *Mediators of Inflammation*, v.2, p.96–100, 2005.
- COHEN, N. Causes of and farm management factors associated with disease and death in foals. *J Am Vet Med Assoc.*, v.204, p.1644-1651, 1994.
- COUTINHO DA SILVA, M.A.; CANISSO, I.F.; MACPHERSON, M.L.; *et al.* Serum amyloid A concentration in healthy periparturient mares and mares with ascending placentitis. *Equine Veterinary Journal*, DOI: 10.1111/evj.12034, 2013.
- CRISMAN, M.V.; SCARRATT, W. K.; ZIMMERMAN, K.L.: Blood Proteins and Inflammation in the Horse. *Vet Clin Equine*, v.24, p.285–297, 2008.
- DI AW, M.; BAILEY, C.S.; SCHLAFFER, D., *et al.* Characteristics of endometrial culture and biopsy samples taken immediately postpartum from normal mares compared with those from mares with induced placentitis. *Animal Reproduction Science*, v.121, p.369–370, 2010.

- DUNCAN, J.R.; PRASSE, K.W.; MAHAFFEY, E.A. Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology. Ames, Iowa State University Press, ed.3, p.330, 1994.
- FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hígidos acometidos por abdômen agudo, antes e após laparotomia. *Arq Bra Med Vet e Zootec.*, Belo Horizonte, v. 54, n. 6, p. 559-586, 2002.
- HARADA, E.; ARAKI, Y.; FURUMURA, E.; *et al.* Characteristic transfer of colostrums-derived biologically active substances into cerebrospinal fluid via blood in natural suckling neonatal pigs. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine* 49, 358–364, 2002.
- JEFFCOTT, L. Duration of permeability of the intestine to macromolecules in the newly born foal. *Vet. Rec.*, v.88, p.340, 1971.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Clinical biochemistry of domestic animals. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997.
- KENT J.E.; GOODALL J. Assessment of an immunoturbidimetric method for measuring equine serum haptoglobin concentrations. *Equine Vet J.*, v.23, p.59–66, 1991.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, v.227, p.680-685, 1970.
- LINS, L.A.; FINGER, I.S.; FERNANDES, C.G.; *et al.* Resposta clínica e metabólica de potros neonatos em relação aos achados histopatológicos da placenta na égua. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, n.6, p.1436-1441, 2012.
- MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal*, v.168, p.28-40, 2004.
- PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J.P.; HEEGAARD, P.M.H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*, v.35, p.163-187, 2004.
- TAKIGUCHI, M.; FUJINAGA, T.; NAIKI, M.; *et al.* Isolation, characterization, and quantitative analysis of c-reactive protein from horses. *Am. J. Vet. Res.*, v.51, p.1215-1220, 1990.
- TALUKDER, M.J.; TAKEUCHI, T.; HARADA, E. Transport of colostrum macromolecules into the cerebrospinal fluid via plasma in newborn calves. *Journal of Dairy Science* 85, 514–524, 2002.

### **3.2 Artigo 2**

#### **RESPOSTA DE FASE AGUDA NO PERIPARTO DE ÉGUAS COM PLACENTITE ASCENDENTE E SEUS RESPECTIVOS NEONATOS**

C. Haetinger; V. Müller; L.S. Feijó; L. Souza; L.A. Amaral; B.R. Curcio; C.E.W.  
Nogueira.

**Será submetido à revista** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*

# RESPOSTA DE FASE AGUDA NO PERIPARTO DE ÉGUAS COM PLACENTITE ASCENDENTE E SEUS RESPECTIVOS NEONATOS

## ACUTE PHASE PROTEINS IN PERIPARTURIENT MARES WITH ASCENDING PLACENTITIS AND THEIR NEWBORNS

C. Haetinger<sup>II\*</sup>; V. Müller<sup>I</sup>; L.S. Feijó<sup>II</sup>; L. Souza<sup>I</sup>; L.A. Amaral<sup>II</sup>; B.R. Curcio<sup>III</sup>; C.E.W.  
Nogueira<sup>III</sup>.

<sup>I</sup>Graduando, Faculdade de Veterinária, UFPel, Pelotas, RS

<sup>II</sup>Pós-Graduando, Faculdade de Veterinária, UFPel, Pelotas, RS

<sup>III</sup>Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, UFPel, Pelotas, RS

\*cloue\_haet@hotmail.com

### RESUMO

A placentite ascendente é uma das principais causas de parto prematuro, aborto e nascimento de potros comprometidos, portanto a busca por marcadores precoces desta afecção se torna fundamental para o diagnóstico e tratamento no estágio inicial da doença. O objetivo deste estudo foi caracterizar a concentração de proteínas de fase aguda no periparto de éguas com placentite ascendente e seus respectivos neonatos. Foram utilizadas 7 éguas mestiças e seus respectivos neonatos, as quais foram submetidas à indução de placentite ascendente entre os dias 290-300 de gestação. As éguas foram submetidas a coletas de sangue 60 dias pré-parto, 30 dias pré-parto, no dia da indução, 24 horas e 48 horas após a indução, no dia que antecedeu o parto, imediatamente após e 24 horas após o parto e os neonatos imediatamente após o nascimento, 12 horas, 24 horas e 48 horas após o nascimento. A concentração sérica de proteína total foi determinada pelo método colorimétrico, e a leitura realizada por espectrofotômetro. Para obtenção da concentração das frações proteicas, utilizou-se eletroforese em gel de acrilaminada contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foram observadas 23 bandas proteicas, com pesos moleculares de 16 KDa a 245 KDa. As éguas submetidas à indução de placentite apresentaram elevação na  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida a partir das 48 horas após a inoculação da bactéria. Com estes resultados podemos

caracterizar as concentrações médias das Proteínas de Fase Aguda em éguas com placentite e seus neonatos para avaliação da saúde nesse período. A  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida pode ser indicada como um marcador inflamatório para a placentite.

Palavras-chave: Equinos, Proteínas de fase aguda, *Streptococcus zooepidemicus*, Eletroforese, Aborto

#### ABSTRATC

The ascending placentitis is a major cause of premature birth, abortion and birth of compromised foals, so the search for early markers of this condition becomes critical for diagnosis and treatment in the early stage of the disease. The aim of this study is to characterize the concentration of acute phase proteins in periparturient mares with ascending placentitis and their newborns. Were used 7 mares and their neonates, which the mares were subjected to induction of ascending placentitis between days 290-300 of gestation. The mares were subjected to blood sampling 60 days prepartum, 30 days prepartum, on the day of induction, 24 hours and 48 hours after induction, the day before delivery, immediately after and 24 hours after delivery and newborns immediately after birth, 12 hours, 24 hours and 48 hours after birth. Plasma total protein concentration was determined by the colorimetric method, and reading performed by spectrophotometer. To obtain the concentration of protein fractions was used acrilaminada gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). Were observed 23 protein bands with molecular weights of 16 kDa to 245 kDa. Mares subjected to induction of placentitis had increased  $\alpha$ 1-acid glycoprotein from 48 hours after bacterial inoculation. With the results we show the average concentrations of acute phase proteins in mares with placentitis and their newborns for health assessment that period. The  $\alpha$ 1-acid glycoprotein may be indicated as an inflammatory marker for placentitis.

Keywords: Equine, Acute phase proteins, *Streptococcus zooepidemicus*, Electrophoresis, Abortion

## INTRODUÇÃO

A placentite ascendente é uma das principais causas de parto prematuro, aborto e nascimento de potros comprometidos. Muitos modelos experimentais estão sendo estudados para investigar estratégias de diagnóstico para evitar perdas gestacionais e nascimento de potros debilitados (Le Blanc, 2010). O principal patógeno causador de infecções placentárias é o *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* (Giles *et al.*, 1993).

A pesquisa para se encontrar marcadores precoces da inflamação vem sendo foco na medicina humana e veterinária ao longo dos anos, utilizando principalmente a identificação bioquímica das “proteínas de fase aguda” (PFAs) como marcadores do grau e do curso da inflamação (Crisman *et al.*, 2008). PFAs são proteínas sanguíneas que sofrem alteração de concentração em animais submetidos a injúrias internas e externas, assim como infecção, inflamação, trauma cirúrgico ou estresse (Murata *et al.*, 2004). As concentrações circulantes das PFAs são relacionadas com a severidade da desordem e da área de tecido afetado (Kent e Goodall, 1991) e a quantificação da sua concentração pode fornecer informações para diagnóstico e prognóstico sobre a afecção do animal (Murata *et al.*, 2004; Petersen *et al.*, 2004).

As proteínas de fase aguda podem ser classificadas como positivas ou negativas (Kaneko *et al.*, 1997). As positivas são aquelas que apresentam um aumento na sua concentração na presença de estímulo inflamatório, e as negativas apresentam decréscimo na concentração na presença deste estímulo. Nas proteínas positivas, enquadram-se, dentre outras, a glicoproteína ácida, a haptoglobina (Takiguchi *et al.*, 1990) e a Amiloide A Sérica (AAS) (Crisman *et al.*, 2008). No grupo das proteínas negativas, destacam-se a albumina e a transferrina, cujos níveis séricos tendem a decrescer na presença de condições inflamatórias (Kaneko *et al.*, 1997).

A PFA mais específica em equinos, e por conta disso a mais estudada na espécie, é a AAS. A elevação de sua concentração basal pode ser 10 a mil vezes (Hulten *et al.*, 2002). Essa PFA já é conhecida como marcador inflamatório em sepse de potros (Stoneham *et al.*, 2001) e vem sendo estudada como marcador inflamatório para placentite em éguas (Coutinho *et al.*, 2013).

O estudo eletroforético representa uma das principais ferramentas para identificar proteínas sanguíneas (Kaneko *et al.*, 1997). Segundo Fagliari e Silva (2002) a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), além de ser de fácil execução, baixo custo e necessitar de um volume reduzido de amostra, possibilita a



visualização de concentrações proteicas extremamente baixas e a identificação de 20 a 30 proteínas com pesos moleculares que variam entre 24.000 a 340.000 daltons.

O objetivo deste estudo é caracterizar a concentração de proteínas de fase aguda no periparto de éguas com placentite ascendente e seus respectivos neonatos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado com éguas mestiças pertencentes ao plantel do ClinEq Medicina de Equinos - Universidade Federal de Pelotas/RS, durante a temporada reprodutiva 2012-2013. Para o modelo experimental deste estudo foram utilizadas 7 éguas mestiças com média de idade nove anos (4-18) e média de peso 419 kg (343-555 kg) e seus respectivos neonatos. As éguas foram submetidas à indução de placentite ascendente, através da infusão intracervical de *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* na concentração de  $10^7$  UFC, entre os dias 290-300 de gestação, conforme protocolo sugerido por Bailey *et al.* (2010). A indução era confirmada através da manifestação de sinais clínicos de placentite (secreção vulvar e desenvolvimento do úbere) 48 horas após.

As éguas eram mantidas a campo nativo, com suplementação 1,5% do peso vivo de concentrado duas vezes ao dia. Todos os partos foram assistidos para avaliar a necessidade de intervenção. O protocolo de tratamento para placentite das éguas consistiu na administração intravenosa de sulfametoxazol e trimetoprim, na dose 30mg/kg, a cada 12 horas, além de flunixin meglumine, na dose 1.1mg/kg, a cada 24 horas, como utilizado por Bailey *et al.* (2010). O tratamento foi iniciado a partir de 48 horas de indução, sendo a duração de dez dias para antibioticoterapia e sete dias para a terapia anti-inflamatória. Após a indução era realizado exame clínico das éguas duas vezes ao dia, até o momento do parto.

Como forma padrão de auxílio imediato ao neonato, foi procedida limpeza das vias aéreas superiores, além de sucção do líquido amniótico contido nas narinas e ventilação através de bombeamento manual de ar. Os potros neonatos foram tratados com ampicilina intravenosa, na dose 22mg/kg e intervalo de 6 horas e flunixin meglumine, na dose 1.1mg/kg a cada 8 horas. Os potros receberam colostro até uma hora após o nascimento e para os potros que se apresentavam debilitados, com ausência de reflexo de sucção, o colostro foi fornecido via sondagem nasogástrica.

Todos animais foram submetidos a coleta de sangue por punção da veia jugular em tubos sem anticoagulante, separando-se o soro para armazenamento a -20°C. Foram coletadas amostras de sangue das éguas em 8 momentos: 60 dias pré-parto (M1), 30 dias pré-parto (M2), no dia da indução (M3), 24 horas (M4) e 48 horas após a indução (M5), no dia que

antecedeu o parto (M6), imediatamente após o parto (M7) e 24 horas após o parto (M8). Os neonatos foram submetidos a coletas de sangue em 6 momentos: imediatamente após o nascimento (C1), 12 horas (C2), 24 horas (C3) e 48 horas após o nascimento (C4).

A concentração sérica de proteína total foi determinada pelo método colorimétrico, por reação com o biureto, utilizando-se kit comercial (Labtest), e a leitura realizada por espectrofotômetro. Para obtenção da concentração das frações proteicas, utilizou-se eletroforese em gel de acrilaminada contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por Laemmli (1970). Após o fracionamento, o gel foi corado durante 10 minutos em solução de azul de coomassie e, em seguida, colocado em solução de ácido acético a 7% para retirar o excesso de corante, até que as frações proteicas se apresentassem nítidas. As concentrações dessas proteínas foram determinadas em densitômetro computadorizado (Shimadzu CS 9301 - Tokio, Japan). Como referência, utilizou-se uma solução marcadora (Sigma - Saint Louis, EUA) com pesos moleculares 29.000, 45.000, 66.000, 97.400, 116.000 e 205.000 dáltons (Da), além de proteínas purificadas – albumina, IgG, haptoglobina e transferrina.

Para avaliar a influência dos diferentes momentos nas proteínas de fase aguda, foi realizada análise de variância simples pelo teste One Way AOV, com a comparação entre médias através do teste LSD. Os dados que não apresentaram distribuição normal no teste de normalidade Shapiro-Wilk, foram analisados através do teste Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV. Estes resultados foram analisados através do programa Statistics 8.0.

## RESULTADOS

No método utilizado foram observadas 23 bandas proteicas, cujos pesos moleculares (PM) variaram de 16 KDa a 245 KDa, sendo possível a identificação das seguintes frações proteicas: imunoglobulina A (175 KDa), ceruloplasmina (102 KDa), transferrina (83 KDa), albumina (63 KDa), imunoglobulina G de cadeia pesada (50 KDa), haptoglobina (41 KDa),  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida (39 KDa) e imunoglobulina G de cadeia leve (28 KDa).

Os valores médios das PFAs encontrados por momento nas éguas e seus respectivos neonatos estão expressos nas Tab. 3 e 4.

A concentração de  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida das éguas apresentou crescimento gradativo a partir das 48 horas após a indução da placentite (Figura 1).

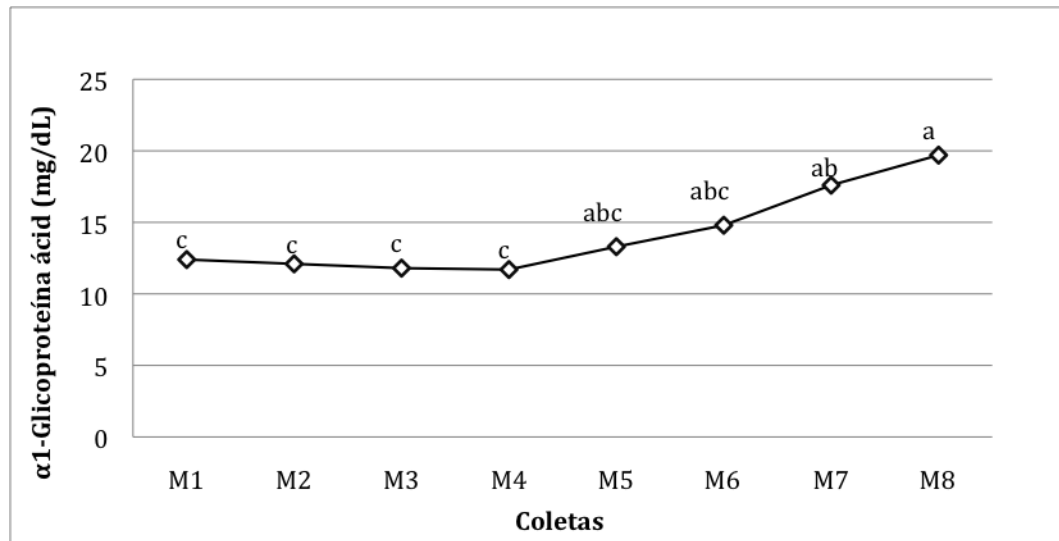


Figura 1. Concentração sérica de  $\alpha 1$ -glicoproteína ácida em éguas com placentite ascendente 60 (M1) e 30 dias pré-parto (M2), no dia da indução da placentite (M3), 24 horas (M4) e 48 horas após a indução (M5), no dia que antecedeu o parto (M6), imediatamente após (M7) e 24 horas após o parto (M8).

Tabela 3. Média e desvio padrão das concentrações das frações proteicas (mg/dL) e da proteína total (g/dL) em éguas com placente ascendente nos momentos: 60 dias pré-parto (M1), 30 dias pré-parto (M2), no dia da indução (M3), 24 horas (M4) e 48 horas após a indução (M5), no dia que antecedeu o parto (M6), imediatamente após o parto (M7) e 24 horas após o parto (M8).

Proteína	N	M1	N	M2	N	M3	N	M4	N	M5	N	M6	N	M7	N	M8
PT (g/dL)	7	7.4±0.4	7	7.7±0.4	6	7.6±0.4	6	7.4±0.4	6	7.3±0.4	7	7.3±0.4	5	7.7±0.5	4	7.3±0.5
Albumina	7	4163±273	7	4388±273	6	4219±294	6	3955±294	6	3915±294	7	3650±273	5	4254±323	4	3874±361
Ceruloplasmina	7	4.3±1.4	7	3.9±1.4	6	4.2±1.6	6	3.6±1.6	6	2.2±1.6	7	3.9±1.4	5	6.3±1.7	4	6.3±1.9
α1-GA	7	12.4±1.6 <sup>C</sup>	7	12.1±1.6 <sup>C</sup>	6	11.8±1.8 <sup>C</sup>	6	11.7±1.8 <sup>C</sup>	6	13.3±1.8 <sup>ABC</sup>	7	14.8±1.6 <sup>ABC</sup>	5	17.6±1.9 <sup>AB</sup>	4	19.7±2.2 <sup>A</sup>
Haptoglobina	7	68±11	7	73±11	6	77±12	6	80±12	6	79±12	7	91±11	5	99±13	4	122±14
IgA	7	186±24	7	159±24	6	188±26	6	178±26	6	195±26	7	170±24	5	164±29	4	203±32
IgG Leve	7	785±59	7	842±59	6	789±64	6	833±64	6	827±64	7	744±59	5	805±70	4	859±78
IgG Pesada	7	731±62	7	621±62	6	699±67	6	754±67	6	644±67	7	580±62	5	639±74	4	646±82
IgG Total	7	1516±108	7	1463±108	6	1489±116	6	1588±116	6	1472±116	7	1324±108	5	1444±127	4	1506±143
Transferrina	7	537±40	7	595±40	6	557±43	6	551±43	6	534±43	7	577±40	5	600±47	4	557±53
23 kDal	7	263±27	7	318±27	6	303±29	6	286±29	6	307±29	7	288±27	5	272±32	4	265±35

As letras maiúsculas (A, B e C) representam diferença estatística ( $p < 0.05$ ) entre os momentos/colunas.

Tabela 4. Média e desvio padrão das concentrações das frações proteicas (mg/dL) e da proteína total (g/dL) nos potros provenientes de éguas com placentite ascendente nos momentos: imediatamente após o nascimento (C1), 12 horas (C2), 24 horas (C3) e 48 horas após o nascimento (C4).

Proteína	N	C1	N	C2	N	C3	N	C4
PT (g/dL)	7	4.3±0.4	8	4.9±0.4	7	5.4±0.4	4	5.4±0.6
Albumina	7	3311±244	8	3240±228	7	3288±244	4	3235±323
Ceruloplasmina	7	11.6±3.5	8	11.1±3.2	7	11.3±3.5	4	11.2±4.6
α1-GA	7	8.9±3.6	8	11.8±3.4	7	19.2±3.6	4	16.7±4.8
Haptoglobina	7	64±19	8	60±18	7	76±19	4	50.5±25
IgA	7	91±21	8	90±19	7	86±21	4	80±28
IgG Leve	7	3.3±113 <sup>B</sup>	8	229±105 <sup>A</sup>	7	373±113 <sup>A</sup>	4	402±149 <sup>A</sup>
IgG Pesada	7	6.2±133 <sup>B</sup>	8	291±125 <sup>A</sup>	7	474±133 <sup>A</sup>	4	541±177 <sup>A</sup>
IgG Total	7	34±240 <sup>B</sup>	8	521±225 <sup>A</sup>	7	847±240 <sup>A</sup>	4	943±318 <sup>A</sup>
Transferrina	7	533±55	8	507±51	7	504±55	4	489±72
23 kDa	7	128±23	8	139±22	7	173±23	4	173±31

As letras maiúsculas (A e B) representam diferença estatística ( $p < 0.05$ ) entre os momentos/colunas.

## DISCUSSÃO

Estudos utilizando proteínas de fase aguda como marcadores precoces de inflamação têm sido foco na medicina humana e veterinária (Cicarelli *et al.*, 2005; Coutinho *et al.*, 2013). Segundo Fagliari e Silva (2002), o estudo eletroforético representa uma das principais ferramentas para identificar proteínas sanguíneas e a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) possibilita a visualização de concentrações proteicas baixas e a identificação de 20 a 30 proteínas com pesos moleculares que variam entre 24 kDa a 340 kDa. Em nosso estudo foram identificadas 23 bandas proteicas, cujos pesos moleculares variaram de 16 KDa a 245 KDa e foi possível a identificação das frações proteicas imunoglobulina A (175 KDa), ceruloplasmina (102 KDa), transferrina (83 KDa), albumina (63 KDa), imunoglobulina G de cadeia pesada (50 KDa), haptoglobina (41 KDa), α1-glicoproteína ácida (39 KDa) e imunoglobulina G de cadeia leve (28 KDa).

A indução de placentite em éguas tem sido estudada como modelo experimental para que se possa identificar estratégias de diagnóstico mais precoces, evitando danos à viabilidade fetal ou o nascimento de potros comprometidos (Coutinho *et al.*, 2013). As éguas deste estudo foram submetidas a indução de placentite através da inoculação intracervical de *Streptococcus zooepidemicus* na concentração de  $10^7$  UFC. Coutinho *et al* (2013) avaliaram a concentração da proteína de fase aguda Amiloide A sérica (AAS) em éguas submetidas a indução de placentite através de metodologia similar e observaram aumento da concentração sérica de AAS 96 horas após a inoculação da bactéria, mantendo-se elevada até o momento do parto/aborto. A AAS é a proteína de fase aguda mais estudada em equinos, já conhecida como marcador inflamatório para placentite (Coutinho *et al.*, 2013) e em sepse de potros (Stoneham *et al.*, 2001). Em nosso estudo essa proteína não foi avaliada devido a incapacidade de detectá-la no método utilizado. No presente estudo, a PFA  $\alpha 1$ -glicoproteína ácida se destacou das demais identificadas na eletroforese, apresentando aumento na sua concentração a partir de 48 horas após a inoculação da bactéria, atingindo maiores concentrações no dia prévio ao parto e após o parto. Os níveis da  $\alpha 1$ -glicoproteína ácida são valiosos para o prognóstico e monitoramento de tratamentos e particularmente úteis como marcadores para a detecção de doenças no estágio inicial, da extensão e progressão da doença, e para acessar a eficácia de tratamentos ou de alterações relacionadas, na tentativa de melhorar o manejo ou o meio ambiente (Smith, 2005). As éguas deste estudo foram submetidas a indução de placentite através da inoculação intracervical de *Streptococcus zooepidemicus* na concentração de  $10^7$  UFC. Coutinho *et al* (2013) avaliou a concentração da proteína de fase aguda Amiloide A sérica (AAS) em éguas submetidas a indução de placentite através de metodologia similar, onde observou aumento da concentração sérica de AAS 96 horas após a inoculação, mantendo-se elevada até o momento do parto/aborto. No presente estudo, a PFA  $\alpha 1$ -glicoproteína ácida se destacou das demais identificadas na eletroforese, apresentando aumento na sua concentração a partir de 48 horas após a inoculação da bactéria, atingindo maiores concentrações no dia prévio ao parto e após o parto. Os níveis da  $\alpha 1$ -glicoproteína ácida são valiosos para o prognóstico e monitoramento de tratamentos e, particularmente, úteis como marcadores para a detecção de doenças no estágio inicial, da extensão e progressão da doença e acessar a eficácia de tratamentos ou de alterações relacionadas, na tentativa de melhorar o manejo ou o meio ambiente (Smith, 2005).

Os potros neonatos apresentaram aumento significativo na concentração de IgG a partir das 12 horas após o nascimento, que representa a concentração de imunoglobulinas adquiridas por transferência passiva, através da ingestão do colostro. O tipo de ligação

placentária em equinos impede a transferência placentária de imunoglobulinas da égua para o feto durante a gestação, assim, os potros nascem agamaglobulinêmicos (Jeffcott, 1971). O colostro fornece uma fonte imediata de imunoglobulinas e a falha na absorção ou aquisição dos anticorpos do colostro ou a falha na transferência passiva no primeiro dia de vida têm sido reconhecidas como importantes fatores de risco para a infecção (Cohen, 1994). O pico da concentração sérica de IgG é entre 18 e 24 horas de vida do potro, sendo este o momento ideal para se buscar se houve falha na transferência passiva de anticorpos. O valor de corte mais comumente utilizado para a avaliação de absorção de IgG é de 800 mg IgG/dl, no qual potros que apresentam valores abaixo deste são candidatos a suplementação com transfusão de plasma. Potros saudáveis apresentam frequentemente valores em torno de 2,400 mg IgG/dl (Barton, 2008). No presente estudo, os neonatos nascidos de éguas com placentite ascendente apresentaram concentração média de  $847 \pm 240$  mg IgG/dl nas 24 horas após o nascimento. Este achado corrobora com a concentração média de 959 mg IgG/dl encontrada por Barton (2006), que avaliou a concentração de IgG em potros neonatos comprometidos com 24 a 72 horas de vida.

## CONCLUSÃO

Com estes resultados podemos caracterizar as concentrações médias das Proteínas de Fase Aguda em éguas com placentite e seus neonatos para avaliação da saúde nesse período. A  $\alpha 1$ -glicoproteína ácida pode ser indicada como um marcador inflamatório para a placentite.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, C.S.; MACPHERSON, M.L.; POZOR, M.A.; *et al.* Treatment efficacy of trimethoprim sulfamethoxazole, pentoxifylline and altrenogest in experimentally induced equine placentitis. *Theriogenology*, v.74, p.402–412, 2010.
- BARTON, M.H. What's Got Them Covered? Innate Immunity and Passive Transfer of IgG. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners - Focus Meeting. First Year of Life* Austin, Texas, USA – 2008.
- BARTON, M.H.; HURLEY, D.; NORTON, N.; *et al.* Serum Lactoferrin and Immunoglobulin G Concentrations in Healthy or Ill Neonatal Foals and Healthy Adult Horses. *J Vet Intern Med.*, v.20, p.1457–1462, 2006.
- CICARELLI, L.M.; PERRONI, A.G.; ZUGAIB, M.; *et al.* Maternal and Cord Blood Levels of Serum Amyloid A, C-Reactive Protein, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$ , and Interleukin-8 During and After Delivery. *Mediators of Inflammation*, v.2, p.96–100, 2005.

- COHEN, N. Causes of and farm management factors associated with disease and death in foals. *J Am Vet Med Assoc.*, v.204, p.1644-1651, 1994.
- COUTINHO DA SILVA, M.A.; CANISSO, I.F.; MACPHERSON, M.L.; *et al.* Serum amyloid A concentration in healthy periparturient mares and mares with ascending placentitis. *Equine Veterinary Journal* ISSN 0425-1644 DOI: 10.1111/evj.12034, 2013.
- CRISMAN, M.V.; SCARRATT, W. K.; ZIMMERMAN, K.L.: Blood Proteins and Inflammation in the Horse. *Vet Clin Equine*, v.24, p.285–297, 2008.
- FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hígidos acometidos por abdômen agudo, antes e após laparotomia. *Arq Bra Med Vet e Zootec.*, Belo Horizonte, v. 54, n. 6, p. 559-586, 2002.
- GILES, R.C., DONAHUE, J.M., HONG C.B., *et al.* Causes of abortion, stillbirth, and perinatal death in horses: 3,527 cases (1986-1991). *J Am Vet Med Assoc.*, v.203, p.1170–1175, 1993.
- JEFFCOTT, L. Duration of permeability of the intestine to macromolecules in the newly born foal. *Vet. Rec.*, v.88, p.340, 1971.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Clinical biochemistry of domestic animals. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997.
- KENT J.E.; GOODALL J. Assessment of an immunoturbidimetric method for measuring equine serum haptoglobin concentrations. *Equine Vet J.*, v.23, p.59–66, 1991.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, v.227, p.680-685, 1970.
- LEBLANC, M.M. Ascending Placentitis in the Mare: An Update. *Reprod Dom Anim* v.45 (Suppl. 2), p.28–34, 2010.
- MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal*, v.168, p.28-40, 2004.
- PETERSEN, H, H.; NIELSEN, J.P.; HEEGAARD, P.M.H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*, v.35, p.163-187, 2004.
- SMITH, K. The glycosylation of alpha-1-acid glycoprotein – structurally complex, functionally important? In: International colloquium on animal acute phase proteins. Dublin, Ireland. *Abstracts and Proceedings Book*. Dublin, p.8, 2005.
- STONEHAM, S.J.; PALMER, L.; CASH, R., *et al.* Measurement of serum amyloid A in the neonatal foal using a latex agglutination immunoturbidimetric assay: determination of the normal range, variation with age and response to disease. *Equine Veterinary Journal*, v.33, p.599–603, 2001.



TAKIGUCHI, M.; FUJINAGA, T. NAIKI, M. et al. Isolation, characterization, and quantitative analysis of c-reactive protein from horses. *Am. J. Vet. Res.*, v.51, p.1215-1220, 1990.

#### **4 CONCLUSÃO GERAL**

Este estudo foi realizado com intuito de encontrar métodos mais seguros para se identificar infecções placentárias durante a gestação em éguas, para que se possa tomar as medidas e tratamento necessários com antecedência, e evitar perdas gestacionais ou nascimento de potros comprometidos.

Com os resultados apresentados neste estudo, podemos caracterizar as concentrações médias das Proteínas de Fase Aguda em éguas com placentite e seus neonatos para avaliação da saúde nesse período. Observamos que a  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida se apresentou de maneira distinta nos animais doentes, podendo ser indicada como um marcador inflamatório para a placentite e para identificação e potros de risco.

## 5 REFERÊNCIAS

AOKI, T.; ISHII, M. Hematological and Biochemical Profiles in Peripartum Mares and Neonatal Foals (Heavy Draft Horse). **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32, p.170-176, 2012.

ALSEMGEEEST, S. P.; TAVERNE, M. A. M.; BOOSMAN, R.; *et al.* Peripartum acute-phase protein serum amyloid-A concentration in plasma of cows and fetuses. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 54, n. 11, p. 164-167, 1994.

BAILEY, C.S.; MACPHERSON, M.L.; POZOR, M.A.; *et al.* Treatment efficacy of trimethoprim sulfamethoxazole, pentoxifylline and altrenogest in experimentally induced equine placentitis. **Theriogenology**, v.74, p.402–412, 2010.

BAIN, F.T. Management of the Foal From the Mare With Placentitis: A Clinician's Approach. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v.50, p.162-164, 2004.

BARTON, M.H. What's Got Them Covered? Innate Immunity and Passive Transfer of IgG. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners** - Focus Meeting. First Year of Life Austin, Texas, USA – 2008.

BARTON, M.H.; HURLEY, D.; NORTON, N.; *et al.* Serum Lactoferrin and Immunoglobulin G Concentrations in Healthy or Ill Neonatal Foals and Healthy Adult Horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.20, p.1457–1462, 2006.

BAUER, J.E., HARVEY, J.W., ASQUITH, R.L., *et al.* Serum protein reference values in foals during the first year of life: comparison of chemical and electrophoretic methods. **Veterinary Clinical Pathology** 14, 14–22, 1985.

BUCCA, S. Diagnosis of the Compromised Equine Pregnancy. **Veterinary Clinics Equine**, v.22, p.749–761, 2006.

CICARELLI, L.M.; PERRONI, A.G.; ZUGAIB, M.; *et al.* Maternal and Cord Blood Levels of Serum Amyloid A, C-Reactive Protein, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$ , and Interleukin-8 During and After Delivery. **Mediators of Inflammation**, v.2, p.96–100, 2005.

COHEN, N. Causes of and farm management factors associated with disease and death in foals. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.204, p.1644-1651, 1994.

COUTINHO DA SILVA, M.A.; CANISSO, I.F.; MACPHERSON, M.L.; *et al.* Serum amyloid A concentration in healthy periparturient mares and mares with ascending placentitis. **Equine Veterinary Journal** DOI: 10.1111/evj.12034, 2013.

CRISMAN, M.V.; SCARRATT, W. K.; ZIMMERMAN, K.L.: Blood Proteins and Inflammation in the Horse. **Veterinary Clinics Equine**, v.24, p.285–297, 2008.

DIAM, M.; BAILEY, C.S.; SCHLAFER, D., *et al.* Characteristics of endometrial culture and biopsy samples taken immediately postpartum from normal mares compared with those from mares with induced placentitis. **Animal Reproduction Science**, v.121, p.369–370, 2010.

DUGGAN, V.E., HOLYOAK, G.R., MACALLISTER, C.G., CONFER, A.W., Influence of induction of parturition on the neonatal acute phase response in foals. **Theriogenology** 67, 372–381, 2007.

DUNCAN, J.R.; PRASSE, K.W.; MAHAFFEY, E.A. Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology. Ames, Iowa State University Press, ed.3, p.330, 1994.

FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L. Hemograma e proteinograma plasmático de eqüinos hígidos acometidos por abdômen agudo, antes e após laparotomia. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 6, p. 559-586, 2002.

FAGLIARI, J.J.; FERREIRA NETO, J.M.; LUCAS, A. *et al.* Proteinograma total e fracionamento eletroforético do soro de bezerros Guzerá passivamente imunizados contra paratifo. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.35, p. 317-332, 1983.

GILES, R.C., DONAHUE, J.M., HONG C.B., *et al.* Causes of abortion, stillbirth, and perinatal death in horses: 3,527 cases (1986-1991). **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.203, p.1170–1175, 1993.

HARADA, E., ARAKI, Y., FURUMURA, E., *et al.* Characteristic transfer of colostrums-derived biologically active substances into cerebrospinal fluid via blood in natural suckling neonatal pigs. **Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine** 49, 358–364, 2002.

HORADAGODA, N.U., KNOX, K.M.G., GIBBS, H.A., *et al.* Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. **Veterinary Record**, v.144, p.437-441, 1999.

HULTEN C.; GRONLUND U.; HIRVONEN J.; et al.: Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and alpha2-globulins during induced noninfectious arthritis in the horse. **Equine Veterinary Journal** 34:699–704, 2002.

JEFFCOTT, L. Duration of permeability of the intestine to macromolecules in the newly born foal. **Veterinary Record**, v.88, p.340, 1971.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997.

KENT J.E.; GOODALL J. Assessment of an immunoturbidimetric method for measuring equine serum haptoglobin concentrations. **Equine Veterinary Journal**, v.23, p.59–66, 1991.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LEBLANC, M.M. Ascending Placentitis in the Mare: An Update. **Reproduction in Domestic Animals** v.45 (Suppl. 2), p.28–34, 2010.

LEBLANC, M.M. Placentitis: Diagnosis and treatment strategies. **Proceedings of the 47th British Equine Veterinary Association Congress BEVA** Sep. 10 – 13, 2008 Liverpool, United Kingdom.

LINS, L.A.; FINGER, I.S.; FERNANDES, C.G.; et al. Resposta clínica e metabólica de potros neonatos em relação aos achados histopatológicos da placenta na égua. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.6, p.1436-1441, 2012.

MATTEWS, A.G. Serum protein electrophoresis in horses and ponies. **Equine Veterinary Journal**, v.14, p.322-324, 1982.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, v.168, p.28-40, 2004.

NUNOKAWA Y, FUJINAGA T, TAIRA T, et al. Evaluation of serum amyloid A protein as an acute phase reactive protein in horses. **Journal of Veterinary Medicine Science** 55:1011–6, 1993.

PALTRINIERI, S.; GIORDANO, A.; VILLANI, M.; MANFRIN, M.; PANZANI, S.; VERONESI, M.C. Influence of age and foaling on plasma protein electrophoresis and serum amyloid A and their possible role as markers of equine neonatal septicaemia. **The Veterinary Journal**, v.176, p.393-396, 2008.

PETERSEN, H, H.; NIELSEN, J.P.; HEEGAARD, P.M.H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v.35, p.163-187, 2004.

RICKETTS, S. Management of the infertile/subfertile mare. In: **Proceedings of 10<sup>th</sup> Internacional Congress of World Equine Veterinary Association**, p.244-256, 2008.

SERTICH, P.L. Clinical anatomy and evaluation of equine fetal membranes. In: **Proceedings of the Annual Meeting of the Society for Theriogenology**, p.178–84, 1993.

SMITH, K. The glycosylation of alpha-1-acid glycoprotein – structurally complex, functionally important? In: International colloquium on animal acute phase proteins. Dublin, Ireland. **Abstracts and Proceedings Book**. Dublin, p.8, 2005.

STONEHAM, S.J., PALMER, L., CASH, R., ROSSDALE, P.D. Measurement of serum amyloid A in the neonatal foal using a latex agglutination immunoturbidimetric assay: determination of the normal range, variation with age and response to disease. **Equine Veterinary Journal**, v.33, p.599–603, 2001.

TAKIGUCHI, M.; FUJINAGA, T. NAIKI, M. *et al.* Isolation, characterization, and quantitative analysis of c-reactive protein from horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.51, p.1215-1220, 1990.

TALUKDER, M.J., TAKEUCHI, T., HARADA, E. Transport of colostral macromolecules into the cerebrospinal fluid via plasma in newborn calves. **Journal of Dairy Science** 85, 514–524, 2002.